



Title	メタロチオネイン欠損による遺伝子発現変化とその生体影響
Author(s)	木村, 朋紀
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3184257
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

メタロチオネイン欠損による遺伝子発現変化と
その生体影響

2001年

木村 朋紀

メタロチオネイン欠損による遺伝子発現変化と
その生体影響

2001年

木村 朋紀

目 次

緒論	1
本論	
第一章 メタロチオネイン欠損により発現変動する遺伝子の検索	4
第一節 改良型Differential Display法による遺伝子の検索	4
第二節 小括	9
第二章 メタロチオネインによる転写因子MTF-1の活性調節	10
第一節 エンドトキシン投与による肝臓MTF-1のDNA結合活性上昇 およびAGP発現誘導へのMTの関与	10
第二節 MREを介するレポーター遺伝子発現へのIL-6の影響	15
第三節 小括	17
第三章 メタロチオネインによる遺伝子発現調節を介した生体防御反応 －急性肝炎モデルを用いた検討－	20
第一節 LPS/GalN惹起致死作用へのZnの影響	21
第二節 LPS/GalN惹起致死作用へのMTの影響	22
第三節 LPS/GalN惹起致死作用関連メディエーターレベルへのMTの 影響	24
第四節 LPS/GalNによるPMN集積作用へのMTの影響	27
第五節 LPS/GalN惹起アポトーシス作用へのMTの影響	30
第六節 小括	34
総括	35
結論	38
謝辞	39
引用文献	40

緒 論

メタロチオネイン (MT) は重金属結合タンパク質として1957年に Margoshes と Vallee によって発見された⁽¹⁾。MTはその構成アミノ酸の約1/3をシステインが占めており、このシステイン残基が全てSHの状態で存在することから重金属結合能とともにラジカルスカベンジ能を有している。MTのラジカルスカベンジ能は非常に高く、MTと同じSH基を有するGSHの10-100倍であると報告されている⁽²⁾。また、MTはCd、Zn、Cu等の重金属や活性酸素種(ROS)を産生する化学物質の投与で誘導されることが知られている⁽³⁾。このような特徴から近年は、1) MTを生体防御因子と位置づけて重金属との結合・解毒やフリーラジカル消去に注目する研究、および、2) 新たなMT誘導剤を検索すると共にMT誘導機序を解明しようとする研究、という二方向からの研究が行われてきた。MT誘導機序についてはZnに関する解析が最も進んでおり、MT遺伝子上流にZn応答配列、MRE (metal responsive element) が存在することが示されている⁽⁴⁾。また、Zn応答に関与する転写因子、MTF (MRE-binding transcriptional factor)-1も同定されている⁽⁵⁾。MTF-1のDNA結合活性はZnにより直接活性化され⁽⁶⁾、なおかつZn刺激によりMTF-1が核移行する⁽⁷⁾ことが明らかにされており、ZnのMT誘導機序は分子レベルでの説明が可能となっている。一方、MTはZn以外にも種々サイトカイン⁽⁸⁻¹¹⁾、グルココルチコイドやレプチン投与⁽¹²⁾により誘導される。この他にもエンドトキシン (LPS) 投与などの実験的起炎刺激時^(13, 14)・新生仔期⁽¹⁵⁾・肝再生^(16, 17)・担癌^(18, 19)・拘束ストレス^(20, 21)など種々の刺激でも誘導される (Table 1)。MTは種々の条件で誘導されるとともに各種動植物から酵母やカビ類に至るまで広く生物界に存在が認められることから、MTが生体内でこれまでに知られていない重要な役割を果たしている可能性が考えられる。また、1993年にMichalskaおよびChoo⁽²²⁾、1994年にMastersら⁽²³⁾によってMT欠損マウスが相次いで作製された。これらマウスは正常に成長・繁殖するもののMichalskaおよびChooが作製したMT欠損マウスの一部には体重増加に異常が認められると報告されている⁽²⁴⁾。この報告もまた、生命活動におけるMTの重要性を示唆している。

MTは細胞質タンパク質であり細胞質で重金属結合能およびラジカルスカベンジ能

を発揮して生体防御に関わっていることが示されてきたが、1982年にBanerjeeら⁽²⁵⁾とDanielsonら⁽²⁶⁾によって相次いでMTの核局在化現象が報告された。現在ではMT核局在機序の解析が進み、未知の核移行経路を介してMTが積極的に核内に運搬されているとする報告⁽²⁷⁾や受動拡散で核内に移行したMTが未知の核局在化因子と結合し核内に保持されるとする報告⁽²⁸⁾がなされている。核内におけるMTの役割としてはROSからのDNA保護が第一に挙げられる。しかし、特定の時期・細胞にのみMTの核局在が認められることから核内MTがDNA保護以外にも時期・細胞特異的な役割を果たしている可能性が考えられる。このような状況下、いくつかの研究グループからMTが転写因子のDNA結合活性を修飾すると報告されMTの遺伝子発現調節能が提唱された⁽²⁹⁻³⁴⁾。MTによって活性修飾を受ける転写因子としては、1) Zn フィンガーを有するもの (Sp1、TFIIIA、エストロゲンレセプター等)、および2) レドックス制御を受けるもの (NF- κ B) の2種があり、MTのDNA結合活性修飾作用を示す実験系はともに現在のところ核抽出液を用いた *in vitro* タンパク質/DNA 結合アッセイ (electrophoretic mobility shift assay; EMSA) や転写因子結合配列をレポーター遺伝子に連結したプラスミドを利用したレポーターアッセイなどにとどまっている。つまり、実際に生体内でMTが遺伝子発現調節を行っているという確証はいまだに得られていない。しかし

Table 1 Summary of MT-inducing agents and conditions

Chemicals	
Heavy metals	Cd, Zn, Cu, Hg <i>etc.</i>
Oxidative stress	<i>t</i> -butylhydroperoxide, paraquat <i>etc.</i>
Anticancer agents	cisplatin, doxorubicin <i>etc.</i>
Hormone	glucocorticoid, leptin
Cytokines	interleukin (IL)-1, IL-6 tumor necrosis factor (TNF)- α interferon
Conditions	
Acute phase	IL-6
Hepatic development	glucocorticoid
Hepatic regeneration	IL-6
Restraint	glucocorticoid

ながら、現在までにMTの核局在が認められている時期には肝再生期^(35, 36)、および新生仔期⁽³⁷⁾があり、これらはいずれも遺伝子発現が劇的に変動していると考えられる時期である。したがって実際に生体内でMTが遺伝子発現調節に関わっている可能性は十分考えられる。

本研究ではMT欠損マウスを利用し、MTの遺伝子発現調節作用が *in vivo* で発揮されることを示した。さらに、遺伝子発現調節を介したMTの生体防御作用について興味ある知見を得たのでここに学位論文としてまとめた。なお、現在ではMTとして4つの分子種 (MT-I、II、III、IV) がクローニングされている^(3, 38, 39)。これらのうちMT-I、IIが肝臓、腎臓、消化管、上皮系組織および脳をはじめとする生体内諸組織に広く存在する主要分子種である。他の分子種、すなわち、MT-IIIは脳および睾丸で、MT-IVは舌や皮膚の上皮細胞で組織特異的に発現している。これら分子種のうち、本研究ではMT-I、IIを対象とした。

本 論

第一章 メタロチオネイン欠損により発現変動する遺伝子の検索

MTにより遺伝子発現調節作用を受ける可能性が指摘されている転写因子は、Zn フィンガーを有するSp1、TFIIIA、エストロゲンレセプター、およびレドックス制御を受けるNF- κ Bなどと多岐にわたる。しかしながら、これら転写因子の標的遺伝子の発現までを観察した例はなく、動物の個体レベルでの検討も行われていない。また、上記Znフィンガーを有する転写因子の活性をMTが修飾するとの報告はすべてMTをZnキレーターとして非生理的条件下で作用させているに過ぎず、MTの生体内での機能を反映しているか疑問である。そこでMT誘導を遺伝子発現を調節するための生体応答であるにとらえ、MTタンパク質レベルが劇的に上昇する新生仔肝臓にターゲットを絞りMT欠損により発現変動する遺伝子を検索した。

第一節 改良型Differential Display法による遺伝子の検索

従来、発現量に差のある遺伝子スクリーニングする手法としてサブトラクション法やDifferential Display (DD) 法が用いられてきた^(40, 41)。これらの方法は優れた手法ではあるがサブトラクション法は遺伝子群すべてを網羅している反面、詳細に差をとらえるには不向きであり、一方、DD法は微細な差をとらえることが可能であるが遺伝子群の全体像を把握することが不可能であるなど、種々の欠点も指摘されている。本研究では遺伝子群すべてを網羅し、なおかつ微細な差をもとらえることが可能である改良型DD法⁽⁴²⁾をスクリーニング法に採用した。

第一項 実験材料および実験方法

実験動物

MT-I, II遺伝子欠損マウスおよびその対照マウス(129/Svマウス)はJackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から購入し、クローズドコロニーとして飼育・維持した。飼育は12時間ごとに明/暗が切り替わる23-24°Cに保たれた動物飼育室内で行い、実験動物用固形飼料(CE-2; 日本クレア, 大阪)と水は自由に摂取させた。雌性マウス3匹を妊娠するまで雄マウス1匹と同一ケージで飼育・交配した。マウスは出生日を0日齢と定義した。

改良型Differential Display法

改良型Differential Display (DD) 法はKohroki らの方法に準じて行った⁽⁴²⁾。以下、操作を簡略に記す。7日齢の野生型およびMT欠損マウスから抽出した total RNA をオリゴdTプライマー(TEP; 5'-GCG AGT CGA CCG TTT TTT TTT TTT TTV N-3')を用いて逆転写し、2本鎖cDNAを合成して*Sau*3AIで完全消化した。このようにして得た断片に2本のオリゴヌクレオチド(5'-CGG GTA AGG GGT CGA CAT GAG TGT-3', 5'-GAT CAC ACT CAT GT-3')から成るアダプターを連結した。アダプター連結cDNA断片を3'側に任意の2塩基を付加した FITC 標識 TEP とアダプタープライマー(AEP; 5'-GTC GAC ATG AGT GTG TGA TCNN-3')とでPCRを行い、その付加配列に相補的な2塩基を持つcDNA断片のみを増幅した。PCR反応生成物を6%変性アクリルアミドゲルで分離、FluorImagerTM(Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA)で検出した。

サブクローニングと同定

バンドをゲルから切り出し再増幅後 pBluescript II にクローニングし、配列を決定した。BLASTプログラムを利用し、GeneBank/EMBL/DDBJデータベースとの相同性を検索した。

Northern blot 解析

3, 7, 21日齢および8週齢の野生型およびMT欠損マウスから抽出した total RNA を10%ホルムアルデヒド含有1.0%アガロースゲルで電気泳動後、ナイロンメンブラン(Hybond-XL; Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)にトランスファーした。

クローニングしたDD断片を[α - 32 P]dCTP (111TBq/mmol; Amersham Pharmacia Biotech) を用いて標識し、プローブとして使用した。内部標準としてマウス 18S rRNA を検出し、プローブとして165bpから203bpまでの領域を用いた。

第二項 実験結果および考察

MT欠損マウスとその対照マウスの7日齢肝臓で発現に差のある遺伝子を改良型 DD 法により検索した結果、MT 欠損により発現変動する 5 種のクローンを得た (Fig. 1)。本実験で用いたMT欠損マウスの変異型 MT-I、II 遺伝子には終止コドンにコードする配列が挿入されている。改良型DD法で用いた制限酵素 (*Sau*3AI) の認識配列の3'末端側に挿入配列がある変異型 MT-I は、理論上野生型 MT-I 遺伝子由来のバンドと異なるサイズのバンドとして検出される。変異型 MT-II は挿入配列が制限酵素認識配列の5'末端側にあり、本実験では同一サイズのバンドとして検出されることが予想される。各クローンの塩基配列を決定しデータベースに登録されている遺伝子とのホモロジー検索を行った結果、バンド1324AおよびBはそれぞれ、変異型MT-Iおよび野生型MT-Iと99%の相同性が認められた (Table 2)。理論通り 2 種のバンドが得られたこ

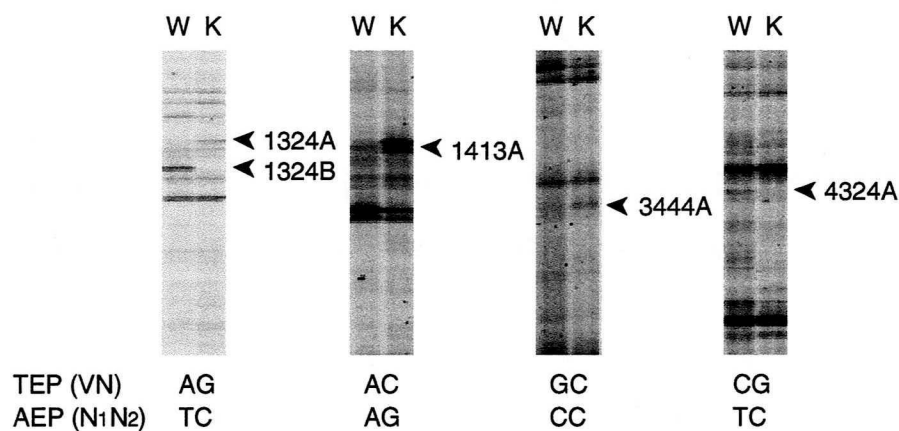


Fig. 1. Electrophoretic gel display of improved DD. Adapter-ligated 3'-end cDNA fragments were synthesized from 10 μ g of total RNA isolated from wild type (W) and MT-null (K) mice, and the fragments were subjected to DD-PCR. PCR products were separated by PAGE and visualized by FluorImagerTM. Variable bases of TEP and AEP are indicated at the bottom of each lane.

とより、本実験系の検出能力が確認された。MTタンパク質レベルは3日齢、7日齢ともに高レベルであり、その後徐々に減少し、21日齢で最大値の1/5-1/10、8週齢で1/10-1/20に低下する⁽⁴³⁾。DD法は7日齢のマウスを用いて行ったが、Northern blot法によりこれら発現の差が週齢を追うごと減少する傾向を認めた (Fig. 2)。すなわち、MT発現量が高い時期にMT欠損の影響が強く現れるという結果を得た。

Table 2 Summary of clones identified by improved DD in MT-null mice

Clone	Change of gene expression ^a	Homology	Accession No.
1324A	↑	metallothionein-I (323/345: 94%) ^b	V00835
1324B	↓	metallothionein-I (323/324: 99%)	V00835
1413A	↑	transketolase (121/124: 97%)	U90889
3444A	↑	vanin-3 (183/183: 100%)	AJ132103
4324A	↓	contrapsin (245/247: 99%)	X55147

^a Up arrows indicate gene expression up-regulated in MT-null mice compared with wild-type mice; down arrows indicate gene expression down-regulated in MT-null mice compared with wild-type mice.

^b The sequence of 1324A closely corresponds to that of MT-I mutant (343/345: 99%) oligonucleotide inserts (5'-CCG GAT AGG TAC CAA TTA T-3') encoding in-frame stop codons.

MT欠損によりシグナル強度が上昇するバンド、1413A、3444Aはそれぞれ、transketolase、vanin-3と95%以上の相同性が認められた (Table 2)。Transketolaseはペントースリン酸経路を構成する酵素の一つである。本経路はペントースを生合成するとともに細胞内で還元剤として作用するNADPHを再生する経路でもある。Vanin-3はそれ自体の機能は不明であるが、2000年、同じファミリーのvanin-1がパントテン酸をリサイクルし、システアミンを生合成する pantetheinaseであると報告された⁽⁴⁴⁾。Vanin-3 は vanin-1 の GPI (グリコシルホスファチジルイノシトール) アンカー構造欠失体であり、アンカー構造以外の領域の配列はvanin-1と相同性が高い^(45, 46)。このよ

うな構造的特徴から、vanin-3はvanin-1と同様のpantetheinase活性を有していると考えられる。Pantetheinaseにより生合成されるシステアミンもNADPH同様、抗酸化作用を有する分子である。つまり、MTという抗酸化因子の欠損により抗酸化作用に関連した現象であるNADPH再生とシステアミン合成が亢進している可能性が示された。これら2遺伝子の発現変化はMT欠損に対する代償機構と考えられる。胎仔・新生仔のMT誘導機序に関しては研究がほとんど進んでいない。唯一の知見は1986年のQuaifeらの報告である⁽¹⁵⁾。彼らは1) 母体側への metyrapone 投与により血中グルココルチコイドレベルを低下すれば胎仔の肝臓 MT mRNA レベルが低下すること2) グルココルチコイド応答配列を欠失したMTプロモーターの活性化が胎仔期に認められないことから、胎仔・新生仔MT誘導のメディエーターがグルココルチコイドである可能性を示している。一方、新生仔肝臓MT誘導の意義に関する知見は皆無である。本節の結果から考えられる、MT欠損に対する代償機構の存在は新生仔肝臓MTが抗酸化因子として作用していることを示唆する初めての例である。

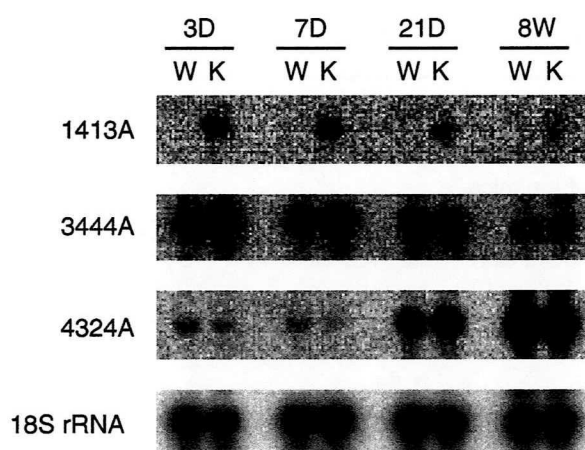


Fig. 2. Northern hybridization of MT-regulated genes during development. Total RNAs were isolated from gestational 3, 7, 21 days and 8 weeks of age in wild type (W) and MT-null (K) mice. Clones corresponding to bands 1413A, 3444A and 4324A were used as probes for transketolase, vanin-3, and contrapsin, respectively.

MT欠損によりシグナル強度が減少するバンド4324Aは血漿セリンプロテアーゼインヒビターのcontrapsinと99%の相同性が認められた。ContrapsinはMT同様、急性期に誘導される。Contrapsin 遺伝子上流配列はいまだ決定されておらず、どのような転写因子により発現調節されているのか等の情報が不足しているが、MT欠損によりcontrapsinの発現が低下することからMTによる転写活性化機構の存在が予想される。

第二節 小括

本章では、新生仔期にMT欠損により発現変動する遺伝子を見いだした。本研究が動物の個体レベルでMT欠損により発現変動する遺伝子を示した初めての例である。MTはヒトをはじめ各種動植物から酵母や微生物に至るまで広く存在が認められることから生命活動に必須のタンパク質であると考えられていたが、その遺伝子欠損マウスが正常に成長・繁殖すると報告された^(22, 23)。この報告を受け、多くの研究者は何らかの代償機構によりMT欠損による障害がレスキューされていると考えた。例えば、Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD) 欠損マウスはMT-I, II の発現が亢進している⁽⁴⁷⁾。これはCu/Zn-SOD欠損による抗酸化能力の低下をMTが補っているものと思われる。しかしながら、MT欠損マウスが作製されて6年経つ現在に至っても、MT欠損の代償機構の存在は示されなかった。本章で同定したMT欠損により発現上昇する2種遺伝子は、ともに抗酸化作用と関連のある遺伝子であった。本研究は動物の個体レベルでMT欠損により発現変動する遺伝子を示しただけにとどまらず、MT欠損の代償機構の存在を示唆した初めての例である。

上述の遺伝子に加えてMT欠損により発現が減少する遺伝子も同定した。この遺伝子は急性期タンパク質 (acute phase protein; APP) の一つ、contrapsin であった。急性期もまた新生仔期同様、MTが高発現する時期である。MTが急性期にAPP遺伝子の発現を調節するという現象の発見は今まで全く未知であった急性期反応 (acute phase reaction; APR) におけるMTの作用を明らかにする手がかりになると期待される。

第二章 メタロチオネインによる転写因子MTF-1の活性調節

第一章ではMT欠損により発現低下する遺伝子としてAPPであるcontrapsinを同定し、MTによる遺伝子発現亢進機構の存在を示唆した。Contrapsin遺伝子の解析はほとんど進んでおらず、プロモーター領域の配列や転写制御に関与する転写因子に関する情報は皆無である。しかしながら、多くの場合遺伝子の発現亢進は転写活性化の結果である。本現象もMTによる転写因子活性化作用に基づいた現象である可能性を考えて検討を行った。MTはZn結合タンパク質であるとともにラジカルスカベンジ能を有していることから、MTによる活性調節を受ける転写因子の候補として 1) Znフィンガーを有するもの、および 2) レドックス制御を受けるものの2つが挙げられる。このうちレドックス制御を受ける転写因子であるNF- κ BやAP-1などはその活性が細胞内酸化状態の亢進により増加する⁽⁴⁸⁾。ContrapsinはMT欠損により発現が低下する遺伝子であり、MT欠損によって細胞内酸化状態が亢進していると考えると転写因子の活性と遺伝子発現レベルが一致しない。一方、Znフィンガーを有する転写因子はZnとの結合によって活性型となる。MT誘導に関連して細胞内Zn量が増大することは周知の事実であり^(37, 49)、MT欠損による細胞内Zn量の低下がMT欠損による遺伝子発現の低下を引き起こすことが想定される。本章では、MTによるZnを介した遺伝子発現調節機構の存在を示すことを目的とした。

第一節 エンドトキシン投与による肝臓MTF-1のDNA結合活性上昇、およびAGP発現誘導へのMTの関与

培養細胞および動物の個体レベルで重金属応答性の転写因子として現在までに報告されているものは、MTF-1 (重金属応答性; 哺乳動物に発現)、Ace1 (Cu応答性; 酵母に発現)⁽⁵⁰⁾、およびZap1 (Zn応答性; 酵母に発現)⁽⁵¹⁾の3種であり、哺乳動物において存在が確認されているものはMTF-1のみである。ただし、ヒトMTF-1には1アミノ酸変異体が存在し、それぞれMTF-1 (別名MTF-1a)、ZRF (zinc regulatory factor; 別名MTF-

1b)と呼ばれている⁽⁵²⁾。また、MT誘導に関連して細胞内Zn量が増大することは既知の事実である^(37, 49)。第一章で、APPの *contrapsin* を MT欠損により発現低下する遺伝子として同定したので、MT誘導刺激としてAPRを惹起するエンドトキシン(LPS)を用い、MT誘導の結果起こる細胞内Zn量の増加がMTF-1の活性化を介して遺伝子発現を亢進する可能性を検討した。

第一項 実験材料および実験方法

動物実験

MT-I, II遺伝子欠損マウス (遺伝的背景は129/Sv) はJackson Laboratory、C57BL/6J マウスは日本クレア (大阪) から購入した。MT 欠損マウスとC57BL/6Jマウスを交配して得た129/Sv × C57BL/6J マウス同士をさらに交配し、その同腹仔を実験に用いた。MT遺伝子の分析はMT-I遺伝子を破壊するために挿入した DNA配列を含む領域をPCRにより増幅し (センスプライマー; 5'-CAC GAC TTC AAC GTC C-3'、アンチセンスプライマー; 5'-CGG TCC CAA CTT GGT A-3')、その増幅産物のサイズをポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析することにより行った。飼育は 12時間ごとに明/暗が切り替わる23-24°Cに保たれた動物飼育室内で行い、固形飼料 (CE-2) と水は自由に摂取させた。

野生型およびMT欠損マウス (8-12週齢, 雌性) に LPS (from *Escherichia coli* O26:B5; Difco, Detroit, MI, USA) を1.0 mg/kg、腹腔内投与した。投与24時間後にエーテル麻酔下、肝臓を摘出した。Total RNAを抽出するために肝臓の一部を使用し、残りは核抽出液の調製とMT定量に用いた。MT濃度は¹⁰⁹Cd/ヘモグロビンアフィニティーアッセイにより測定した⁽⁵³⁾。

核抽出液の調製およびゲルシフトアッセイ

核抽出液はDaltonらの方法に従って調製した⁽⁵⁴⁾。本操作はDTT (1 mM)、PMSF (1 mM)、ロイペプチン (1 µg/ml)、ペプスタチンA (1 µg/ml)、アンチパイン (0.3 µg/ml) 存在下で行った。ゲルシフトアッセイ (EMSA) の結合反応は、結合緩衝液 (12 mM

HEPES, pH 7.9、5 mM MgCl₂、60 mM KCl、0.5 mM DTT) に 2 µg poly(dI-dC)、5-10 fmol ³²P標識MREsオリゴヌクレオチド (upper strand; 5'-GAT CCA GGG AGC TCT GCA CAC GGC CCG AAA AGT A-3')、核抽出液 (タンパク質 20 µg 相当量)を加え、最終容積を 20 µl として行った。氷冷下30分のインキュベート後、タンパク質-DNA複合体を 6% 非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (15V/cm, 4°C)し分離した。ゲルは乾燥後、標識複合体をBAS system (フジフィルム, 東京)により検出した。また、競合実験には変異型 MREs (mutMREs; upper strand; 5'-GAT CCA GGG AGC TAA TTA CTC CGC CCG AAA AGT A-3') および Sp1 オリゴヌクレオチド (upper strand; 5'-GAT CCC GGC CCC GCC CAT CCC CGG CCC CGC CCA TCC A-3') を用いた。

Northern blot 解析

第一章、第一節に準じて行った。 α_1 -酸性糖タンパク質 (AGP) のプローブとしてマウスAGP-1 cDNAの451bpから613bpまでの領域を使用した。

第二項 結果および考察

急性期のMT誘導がMTF-1活性の上昇をもたらすことを示す目的でMT欠損マウスを用いてLPS投与後のMTF-1のDNA結合活性をEMSAにより検討した。野生型マウス肝臓から調製した核抽出液と³²P標識MREsとを混合することにより得られる移動度の小さいバンドは200倍の非標識プローブ自身では競合されたが、非標識 mutMREs および Sp1 では競合されなかった (Fig. 3C)。EMSAにおいて、プローブと結合しているタンパク成分を同定するには抗体によるスーパーシフトバンドを観察するのが通例である。しかしながら、現在のところ MTF-1/MREs複合体をスーパーシフトする MTF-1抗体の報告はない。MREsに結合するタンパク質としては唯一 MTF-1が知られていること、および先述のバンド成分がMREsに特異的に結合していたことから、前述のバンドはMTF-1/MREs複合体バンドであると考えた。野生型マウスではLPS投与24時間後にMT誘導およびMTF-1のDNA結合活性の増加が認められた (Fig. 3A, B)。この MTF-1活性化はLPS投与による肝臓Zn含量の増加によるものであると考えられるが、

MTF-1は重金属以外に酸化ストレスでも活性化される^(54, 55)。LPS投与は肝臓Zn含量を増加する一方で酸化ストレスを惹起する⁽⁵⁶⁾ことから、野生型マウスで認められたMTF-1活性化がLPS投与による酸化ストレスに起因する可能性もある。しかしながら、MT欠損マウスではLPS投与によるMTF-1活性化が認められなかった (Fig. 3A)。LPS投与によりMT欠損マウスは野生型マウス同様、もしくはそれ以上の酸化ストレスにさらされるものと考えられる。したがって、野生型マウスで認められたMTF-1活性化は、MT誘導の結果として増加したZnによるものであると考えられる。

次に、本条件下でMTF-1支配のAPPの発現がMT欠損による影響を受けることを確認するためMTF-1支配のAPPの発現をNorthern blot 法により調べた。Contrapsin 遺伝子の解析はほとんど進んでおらず、プロモーター領域の配列や contrapsin 遺伝子発現に関与する転写因子に関する情報はない。そこで、プロモーター領域に MRE配列がある急性期タンパク質のひとつ、AGPの発現をNorthern blot 法により調べた。その結

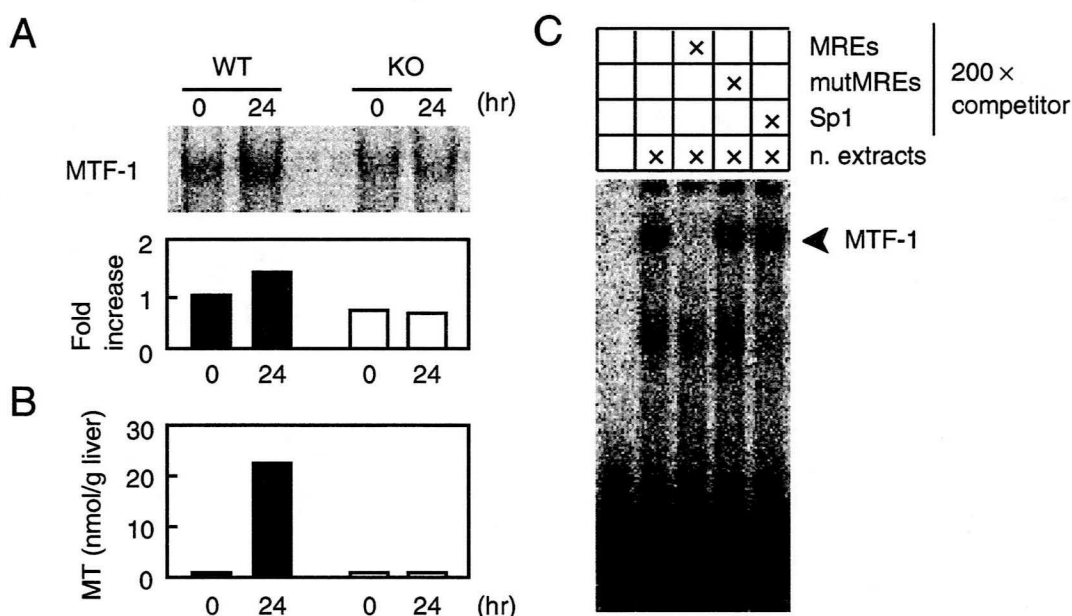


Fig. 3. Effects of LPS on MTF-1 DNA-binding activity and MT level in wild type and MT-null mice. Wild type (WT) and MT-null (KO) mice were administrated LPS (1.0 mg/kg, *i.p.*). A, Nuclear extracts from liver were prepared and analyzed by EMSA. Graph indicates the quantification of MTF-1 DNA-binding band. B, Hepatic MT concentrations were measured by ¹⁰⁹Cd/hemoglobin affinity assay. C, Competition of MTF-1 specific binding were performed by 200-fold molar excess of non-labeled oligonucleotides. These experiments were repeated 3 times independently, and similar results were obtained. The results of one representative experiment are shown.

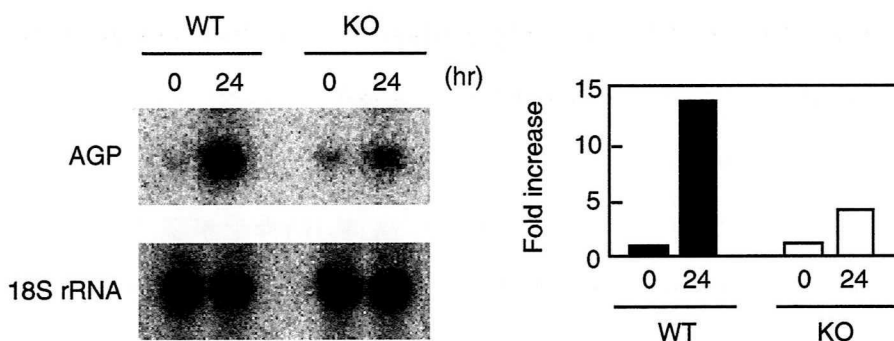


Fig. 4. Effect of LPS on AGP mRNA level in wild type and MT-null mice. Wild type (WT) and MT-null (KO) mice were administrated LPS (1.0 mg/kg, *i.p.*). Total RNAs were then isolated and analyzed by Northern blot analysis. A nucleotide 451-613 of the mouse AGP-1 cDNA sequence and a nucleotide 165-203 of mouse 18S rRNA were used as mouse AGP and 18S rRNA probes, respectively. Graph indicates the quantification of the AGP mRNA levels. Intensities of the AGP mRNA signals were normalized with those of 18S rRNA-derived signals. This experiment was repeated 3 times independently, and similar results were obtained. The results of one representative experiment are shown.

果、野生型、MT欠損マウスで定常状態での発現は同レベルであったが、LPS投与24時間目においてAGP発現に差が認められた (Fig. 4)。野生型マウスではLPS投与によりAGP発現が約14倍に増加したが、MT欠損マウスでは約4倍の増加に過ぎなかった。本遺伝子は急性期においてMT欠損により発現低下する遺伝子であるにも関わらず、第一章では新生仔期にMT欠損により発現変導する遺伝子として検出されなかった。第一章でスクリーニング法として用いた改良型 DD法はcDNAを制限酵素で完全消化して生じる3'末端側断片をPCRで増幅して検出する。したがって、本法は3'末端側断片が極端に短くなる遺伝子は検出不可能であるという欠点を有している。本法で用いる制限酵素は4塩基認識の*Sau3AI*であるので平均サイズ 256 bpの断片が生じるが、AGP遺伝子は 24 bpの3'末端断片を生じる。このためにAGPがMT欠損により変化する遺伝子として検出されなかったのではないかと考えられる。AGP誘導はLPS刺激によりマクロファージ系細胞などから産生された IL-6が肝実質細胞に作用することにより起こる。したがって、MT欠損マウスにおいてIL-6産生やIL-6応答性が低下したために急性期にMT欠損によりAGP発現が低下した可能性も考えられる。しかしながら、RofeらはMTF-1支配ではないAPPの一つ、フィブリノーゲン発現のLPS応答性が野生型、MT欠損マウスで差が認められなかったと報告している⁽⁵⁷⁾。これらを総

合すると、急性期に認められるMT誘導の結果起こる肝臓Zn含量の増加がMTF-1 DNA 結合活性を上昇し、遺伝子発現を活性化すると考えられる。

第二節 MREを介するレポーター遺伝子発現へのIL-6の影響

第一節では急性期のMT誘導に関連してMTF-1が活性化される可能性を示した。しかしながら、LPSは多様な生理作用を有するため前節の検討のみではLPSのMT誘導以外の作用がMTF-1活性化を引き起こしている可能性を否定できない。そこで、マウス個体レベルではなく細胞レベルで同様の現象が認められるかどうか検討した。

第一項 実験材料および実験方法

試薬

リコンビナントヒトIL-6 (rhIL-6; 5.2×10^6 U/mg) は中外製薬株式会社より供与いただいた。

細胞培養と遺伝子導入

ヒト肝癌細胞、HepG2 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS; Filtron, Brooklyn, Australia) 含有ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM; 日水製薬, 東京) にて維持・継代を行った。遺伝子導入はリン酸カルシウム法により行った。遺伝子導入後、12時間培養し、その後 rhIL-6 (500U/ml) とデキサメタゾン (Dex; 1 μ M) で24時間処理した。細胞溶解液を調製し、溶解液中のルシフェラーゼ活性をルミノメーター (EG & G Berthold, Bed Wildbad, Germany) で測定した。ルシフェラーゼ活性はタンパク含量で補正した。また、細胞内MT濃度は ^{109}Cd /ヘモグロビンアフィニティーアッセイにより定量した⁽⁵³⁾。

プラスミドの構築

遺伝子導入に用いるプラスミドは minimal SV40 プロモーターを持つベクター、

PGV-P2 (東洋インキ, 東京) から構築した。MRE支配のレポーター遺伝子はSV40プロモーターの上流に MREd (マウスMT-Iプロモーターの-160bpから-128bpまでの領域) 配列を4コピー連結することにより得た。すべてのプラスミドは常法に従い増幅し、塩化セシウム密度勾配遠心法により精製した。

第二項 結果および考察

急性期MT誘導の最終的なメディエーターであるIL-6⁽¹⁴⁾ がMTF-1活性化をもたらすことをPGV-P2 MREd4 の一過性発現系を用いて解析した。本節でMRE配列として用いた MREd はマウス MT-I プロモーター領域中、最大のZn応答性を示すと評価されているMRE配列である⁽⁴⁾。また、PGV-P2 MREd4 が Zn 応答性を示すことは確認済みである。IL-6の24時間処理によりMTタンパク質は約1.4倍に誘導された (Fig. 5C) 。SV40プロモーターのみを連結したレポータープラスミド (PGV-P2) の活性は IL-6 による影響を受けなかったが、PGV-P2 MREd4 は IL-6 によって約2倍の活性化が認められた (Fig. 5B)。本節の検討により、急性期 MT 誘導の最終的なメディエーターである IL-6 の直接作用によりMRE活性化がもたらされることが明らかとなった。IL-6シグナルにはRas依存経路と非依存経路の2経路が存在する。Ras依存経路ではIL-6刺激後Ras依存性 MAP kinase カスケードによって転写因子NF-IL6がリン酸化を受けて転写が促進される⁽⁵⁸⁾。Ras非依存経路ではSTAT (signal transducers and activators of transcription) 3 が JAK (*Janus* kinase) により直接リン酸化を受け、ホモダイマーを形成して転写活性可能を獲得することにより転写が活性化される⁽⁵⁹⁾。このようにIL-6は多岐にわたる遺伝子の発現を誘導する。MT誘導はIL-6の転写活性化作用の一つに過ぎず、本節の結果のみではMT誘導とMRE活性化が関連した現象であるとは言い切れない。しかしながら、本節の結果は少なくともMTF-1活性化がIL-6を介した現象であることを示唆している。また、LPSによりMTF-1が活性化され、この活性化がMT欠損により消失するという前節の結果と総合すると、急性期MT誘導がMTF-1活性化を引き起こしていると考えられる。

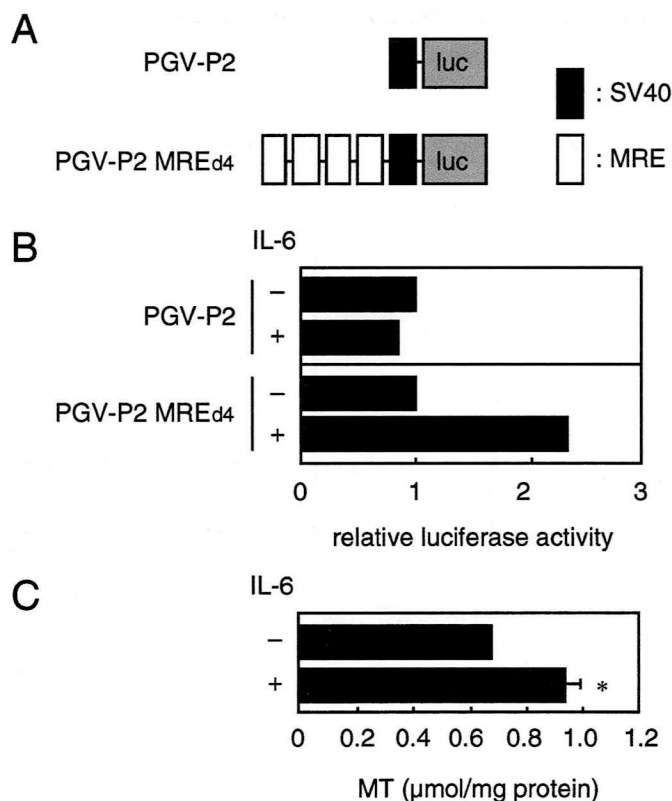


Fig. 5. Effect of IL-6 on MRE-driven gene expression in HepG2 cells. A, schematic representation of the reporter plasmid. B, relative luciferase activities in HepG2 cells transiently transfected with PGV-P2 or PGV-P2 MREd4. C, MT concentrations in HepG2 cells. These cells were treated with rhIL-6 (500 U/ml) plus Dex (1 μM). These experiments were repeated 3 times independently, and similar results were obtained. The results of one representative experiment are shown. *Significantly different from control group ($p < 0.01$).

第三節 小括

本章の結果は急性期のMT誘導がMTF-1活性化をもたらすことを示唆している。MT誘導に付随して細胞内Zn量が増大すること^(37, 49)から、MT誘導の結果引き起こされる細胞内Zn量の増加がMTF-1の活性化を介して遺伝子発現を亢進するというモデルを考えた (Fig. 6)。MT遺伝子の発現上昇により金属非結合型MT(apoMT)が合成される。このapoMTはただちに細胞内のZnと結合する。Znは血漿から十分供給されるのでMT誘導は細胞内Znの上昇を引き起こす。その結果として細胞内のZnプールが増加し、

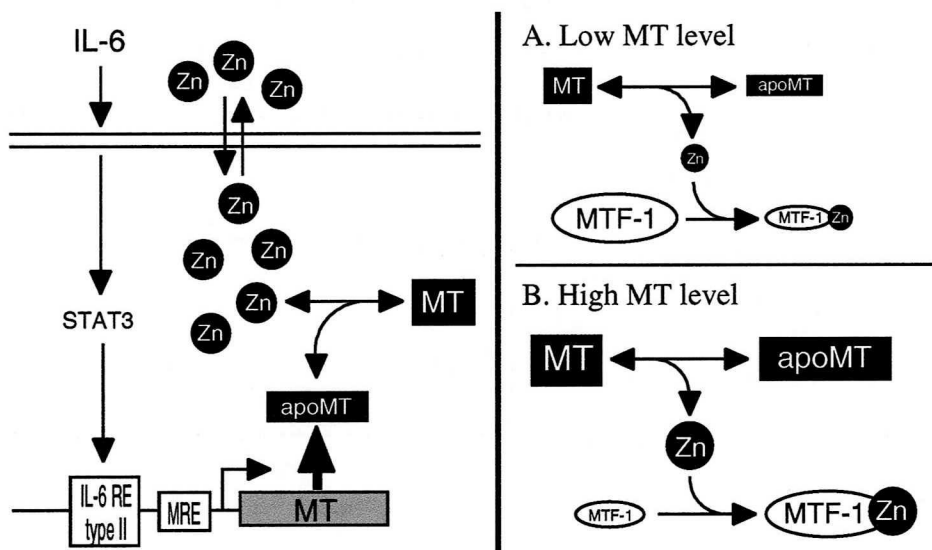


Fig. 6. Postulated mechanism of MT-mediated MTF-1 activation during acute-phase reaction.

MTF-1が活性化される、というモデルである。

MTF-1は6個の連続したC2H2型Znフィンガーを有しており、この領域がDNA結合部位であることが示されている⁽⁶⁰⁾。このZnフィンガーのうちN末端側の4つのZn

Table 3 Comparison of the MRE in the promoters of the MTF-1 targeting genes

Gene	MRE sequence and location
MRE core sequence	TGCRCN
MT-I (mouse)	-174 CTGTGCACACTG -163 -149 CTCTGCACTCCG -138 -131 AAGTGCCTCGG -120 -56 GTTTGCACCCAG -67 -54 CTTTGCGCCCGG -43
Zn transporter-1 (mouse)	-103 GTCTGCAAAGGA -92 -122 GAGTGCAAAGCA -111
γ -glutamylcysteine synthetase (human)	-132 CCTTGACACGC -127
Cu/Zn-SOD (rat)	-277 CCAGGCGCGCAC -267
AGP-1 (mouse)	-592 CTGTGCACAGAC -581 -149 AGCTGCACAAAG -138
C-reactive protein (mouse)	-210 TTTTGCTTCCCT -199

フィンガーは通常の DNA 結合に関与し、C 末端側の 2 つの Zn フィンガーが Zn による活性制御に関わっていると考えられている^(61, 62)。また、細胞あるいは動物の個体レベルで MTF-1 を活性化する刺激としては重金属と酸化ストレス (H_2O_2 、*t*-butylhydroquinone) が知られていた^(54, 55)。一方、MT 遺伝子発現上昇が MTF-1 を活性化することを示唆する知見は本章で記述した以外に Palmiter の報告がある⁽⁶³⁾。彼はハムスター腎臓細胞株 BHK 細胞に MT-I 遺伝子発現ベクターと MRE をプロモーター領域に連結したレポータープラスミドとを安定発現し、各種濃度の Zn 存在下での MRE 活性を評価した。培地中の Zn 濃度が 10 μ M という生理的条件下における MRE 活性はコントロール細胞で最大活性の 1% 未満であるのに対し、MT-I 発現細胞で約 10% であったと報告している。MTF-1 支配遺伝子には MT 以外に数種の遺伝子がある (Table 3)。Zn を細胞内から外へ汲み出すトランスポーターである Zn transporter-1⁽⁶⁴⁾、細胞内レドックス環境の維持に関わる γ -glutamylcysteine synthetase⁽⁶⁵⁾ と Cu/Zn-SOD⁽⁶⁶⁾、APP である AGP と C-reactive protein⁽⁶⁷⁾ である。1) MT が急性期に誘導されること、2) MTF-1 が APP の発現を調節していること、3) 新生仔期に MT 欠損が Zn により発現上昇する APP、contrapsin の発現を低下することなどから MT 誘導の結果引き起こされる細胞内 Zn 量の増加が MTF-1 活性化を介して遺伝子発現を亢進するというモデルの妥当性がうかがえる。また、MTF-1 が急性期にも活性化されることを示したことにより、MTF-1 が重金属および酸化ストレス防御システムに関わるだけでなく炎症反応にも関与する可能性を示したものと考ええる。

第三章 メタロチオネインによる遺伝子発現調節を介した生体防御反応 ー急性肝炎モデルを用いた検討ー

MTが急性期に、特に肝臓で誘導されて肝臓Zn量を増加することは古くから知られていた。しかしながらその生理的意義に関しては、1) Znを肝臓に集積しZn酵素などにZnを供給するため 2) 炎症反応に伴う酸化ストレスに対抗するためなどの説が提唱されてきたが、いずれも仮説の域を出ていない。この領域の報告は、1996年のRofeらによるものが唯一である⁽⁵⁷⁾。彼らは「MT欠損により急性期の糖代謝変化に対する対応能が低下する」と報告しており、糖代謝に関わるZn酵素へのZn供給の不足がこの現象の原因ではないかと考察した。MTがZn酵素の活性を修飾する可能性は以前から指摘されており、aldoraseや carbonic anhydrase 活性へのMTの修飾作用が *in vitro* 実験系で調べられている⁽⁶⁸⁾。一方、APPは何らかの形で炎症反応を調節すると考えられている。しかしながら、その意義が明確に示されている例は少なく、マウスにおいてはAGPに限られる。AGPはグラム陰性菌感染に対して防御的に作用する⁽⁶⁹⁾とともに急性肝炎モデルにおいて生体防御作用を担っている⁽⁷⁰⁾ことが示されている。LPSとD-ガラクトサミン (GalN) の同時投与は肝臓のネクロシスを誘導し、個体を

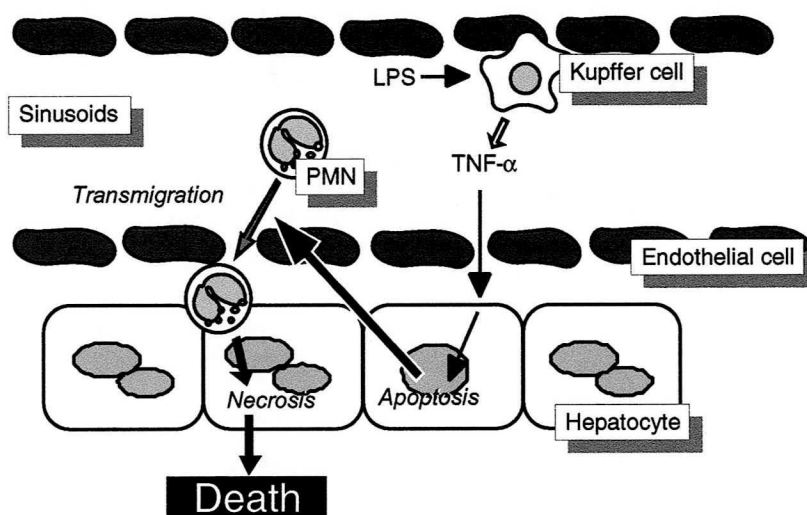


Fig. 7. Postulated mechanism of LPS/GalN-induced liver injury and lethality.

死に至らしめる急性肝炎モデルである⁽⁷¹⁾ (Fig. 7)。この際のメディエーターはTNF- α とされている⁽⁷²⁾。LPS刺激によりクッパー細胞など、マクロファージ系細胞から放出されたTNF- α は肝臓の実質細胞に作用しアポトーシスを引き起こす⁽⁷³⁾。このアポトーシスが引き金となり、好中球 (polymorphonuclear leukocytes: PMN) がシヌソイドから組織側へと浸潤する⁽⁷⁴⁾。PMNはROSを放出し肝臓を障害する。AGPはこのモデルにおいてアポトーシスを抑制することにより、後に起こるネクローシスを防ぐことが知られている。したがって、AGP発現の低下は、LPS/GalN惹起致死および肝障害感受性を亢進することが予想される。本章では、MT欠損によるZn動態の変化がもたらすAPP遺伝子発現の低下が生体に及ぼす影響を検討した。

第一節 LPS/GalN惹起致死作用へのZnの影響

MT誘導によりAGP発現レベルが上昇する原因のひとつと考えられる肝臓Zn量の増加がLPS/GalN惹起致死作用を軽減しうるかどうか検討した。

第一項 実験材料および実験方法

動物実験

実験動物は第一章、第一節に準じた。

C57BL/6Jマウス (8-10週齢, 雄性) にZn (20 mg/kg, *s.c.*) 投与し、その3時間後に LPS (5 μ g/kg) とGalN (700 mg/kg; Sigma, St. Louis, MO, USA) を腹腔内投与した。生存率をLPS/GalN投与24時間後まで観察した。

統計分析

生存率はKaplan-Meier法 (Product-limit法) により累積生存率を算出し、logrankテストによって有意差検定を行った。 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

第二項 結果および考察

Zn投与はLPS/GalN惹起致死作用を軽減した(Fig.8)。なお、予備実験によりLD₈₀となるLPS投与量を決定し、この条件で実験を行った。本結果は肝臓Zn量の増加および、これに続くMTF-1活性化・AGP発現上昇がLPS/GalN惹起致死作用を軽減しうる可能性を示している。しかし、Zn投与は肝臓Zn量のみを増加するわけではなく、各臓器のZn量を増加する。また、Zn自身がMT誘導剤であるとともに抗酸化因子として作用する可能性が報告されていること⁽⁷⁵⁾などを考慮すると、以上の結果から短絡的に結論づけることは危険であると考えている。この危険性を示す例として以下のようなものがある。四塩化炭素は代謝活性化され三塩化炭素ラジカルとなり肝障害を引き起こす⁽⁷⁶⁾が、この障害はZn前投与により軽減できる⁽⁷⁷⁾。ZnがMTを誘導すること、および、MTがラジカルスカベンジ能を有していることからZn前投与による肝障害軽減作用の作用本体はMTであると考えられてきた。しかしながら、著者らの検討によりZn前投与による肝障害軽減作用はMT欠損マウスでも認められた⁽⁷⁸⁾。本項において示したZnによる致死軽減についても上記のような誤認がないよう更なる検討が必要である。

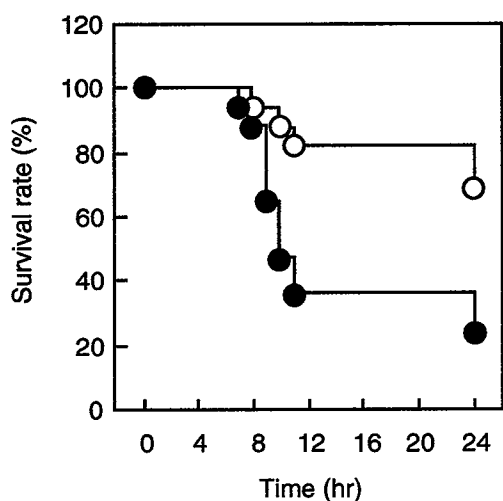


Fig. 8. Prevention of LPS/GalN-induced lethality by zinc. Mice were intraperitoneally given a single dose of LPS (5 µg/kg) plus GalN (700 mg/kg) 3 hours after administration of saline (●, $n = 17$) and zinc (20 mg/kg, s.c.; ○, $n = 16$). Significant differences were analyzed by the Kaplan-Meier (Product-Limit) method and logrank test. Survival rates in saline and zinc administrated mice were significantly different at $p < 0.01$.

第二節 LPS/GalN惹起致死作用へのMTの影響

本節では、MT欠損がLPS/GalN惹起致死および肝障害感受性を亢進する可能性について検討を行った。

第一項 実験材料および実験方法

動物実験

実験動物は第一章、第一節に準じた。

野生型およびMT欠損マウス (8-12週齢, 雄性) にLPS (100 μ g/kg) とGalN (700 mg/kg) を腹腔内投与し、生存率を24時間後まで観察した。

組織学的観察のため、野生型およびMT欠損マウスをエーテル麻酔下、中性緩衝ホルマリンによる灌流固定を行った。肝臓・肺・脾臓・脳・心臓・腎臓をパラフィン包埋し切片のヘマトキシリン-エオシン染色を行った。

統計分析

有意差検定法は第三章、第一節に準じた。

第二項 結果および考察

Fig. 9 にLPS/GalN投与後の生存曲線を示した。本実験では投与量を野生型マウスで

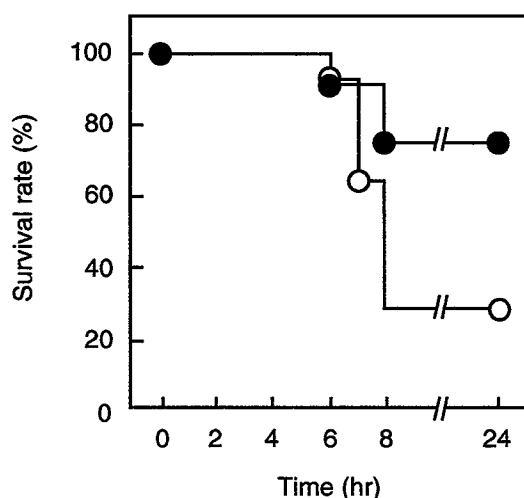


Fig. 9. Survival curve of wild type (●, $n = 12$) and MT-null mice (○, $n = 14$) in response to intraperitoneal administration of LPS (100 μ g/kg) plus GalN (700 mg/kg). Survival rates in wild type and MT-null mice were significantly different at $p < 0.05$.

LD₂₀となるように設定した。MT欠損によってLPS/GalN惹起致死感受性の亢進が認められた ($p < 0.05$)。また、LPS/GalN 投与 6 時間後の肝臓の組織像から、野生型およびMT欠損マウスともに肝細胞の肥大 (単細胞あるいは小葉中心性)、空胞化および壊死が観察された (Fig. 10)。肝細胞壊死の病変程度は野生型マウスよりもMT欠損マウスにおいて、より重篤であった。脳、心臓および腎臓に異常は認められなかった。LPS/GalN投与6時間後に肺の血管周囲性もしくはびまん性の細胞浸潤、脾臓の赤脾髄の萎縮も観察されたが、死亡原因となるような重篤な変化ではなかった。以上の結果は、MT 欠損による AGP 発現の低下が LPS/GalN 惹起肝障害感受性を亢進するという仮説に合致する。

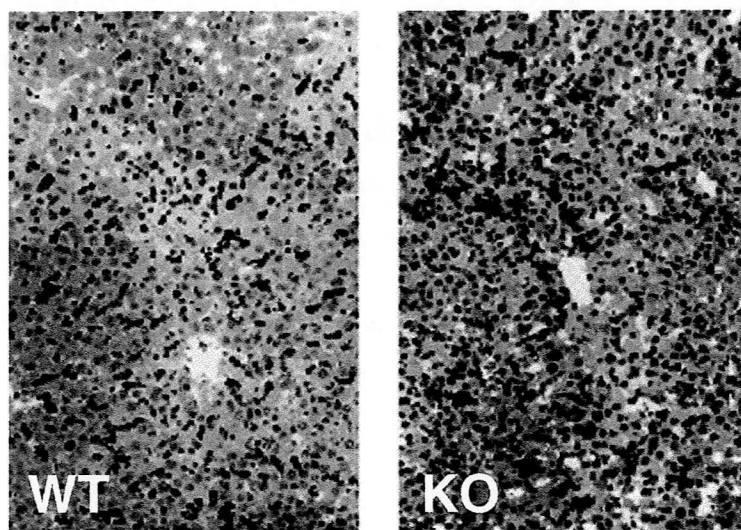


Fig. 10. Hematoxylin and eosin-stained liver section from mice 6 hours after administrated with LPS/GalN.

第三節 LPS/GalN惹起致死作用関連メディエーターレベルへのMTの影響

LPS/GalN惹起急性肝炎モデルの致死メディエーターはTNF- α である⁽⁷³⁾。マクロファージ系細胞のTNF- α 産生は転写因子、NF- κ Bによる制御を受けている⁽⁷⁹⁾。MTがNF- κ Bの活性を修飾していることが指摘されている^(24, 25)ことから、MT欠損によるLPS/GalN 惹起肝障害感受性亢進は TNF レベルの差に起因しているかもしれない。本節ではこの可能性について検討した。また、このモデルにおける肝障害をメディ

エートする因子として、TNF- α 以外に一酸化窒素 (NO) ⁽⁸⁰⁾ および血小板活性化因子 (PAF) ⁽⁸¹⁾ が知られている。これら因子の血中レベルに関しても検討を加えた。

第一項 実験材料および実験方法

試薬

リコンビナントマウスTNF- α はPepro Tech, Inc. (Canton, MA, USA) から購入した。PAF (1-*O*-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine)は Sigma (St. Louis, MO, USA) から入手した。

動物実験

実験動物は第一章、第一節に準じた。

野生型およびMT欠損マウス (8-12週齢, 雄性) にLPS (100 μ g/kg) とGalN (700 mg/kg) を腹腔内投与し、エーテル麻酔下採血を行い血清を得た。血漿を得るための採血では抗凝固剤としてヘパリンもしくは1/10容のクエン酸ナトリウム (0.1 M)を使用した。

血清中TNFおよび血漿中NO代謝物の定量

血清中TNFレベルはL929細胞を用いたバイオアッセイで定量した⁽⁸²⁾。NO生成量を評価するため、NO₂⁻とNO₃⁻量を測定した。以下に測定法を簡略に記す。NO₃⁻は nitrate reductase で NO₂⁻に還元し、NO₂⁻は Griess 反応に基づいた分光学的測定法で定量した⁽⁸³⁾。

血漿中PAFレベルの定量

血漿PAFレベルはウサギ血小板のセロトニン放出量から評価した。血漿中のPAFは逆相カラム (Amrep Minicolumn; Amersham International, Bucks, UK) により抽出した⁽⁸⁴⁾。このPAF抽出液はPAF濃度依存的なセロトニン放出を引き起こすため、ウサギ血小板に添加した⁽⁸⁵⁾。放出されたセロトニンは 0.05% *o*-phthalaldehyde/ 10% ethanol/8 M HCl と反応させ、生じた蛍光物質を蛍光分光光度計で測定 (Ex; 360 nm, Em; 475 nm)

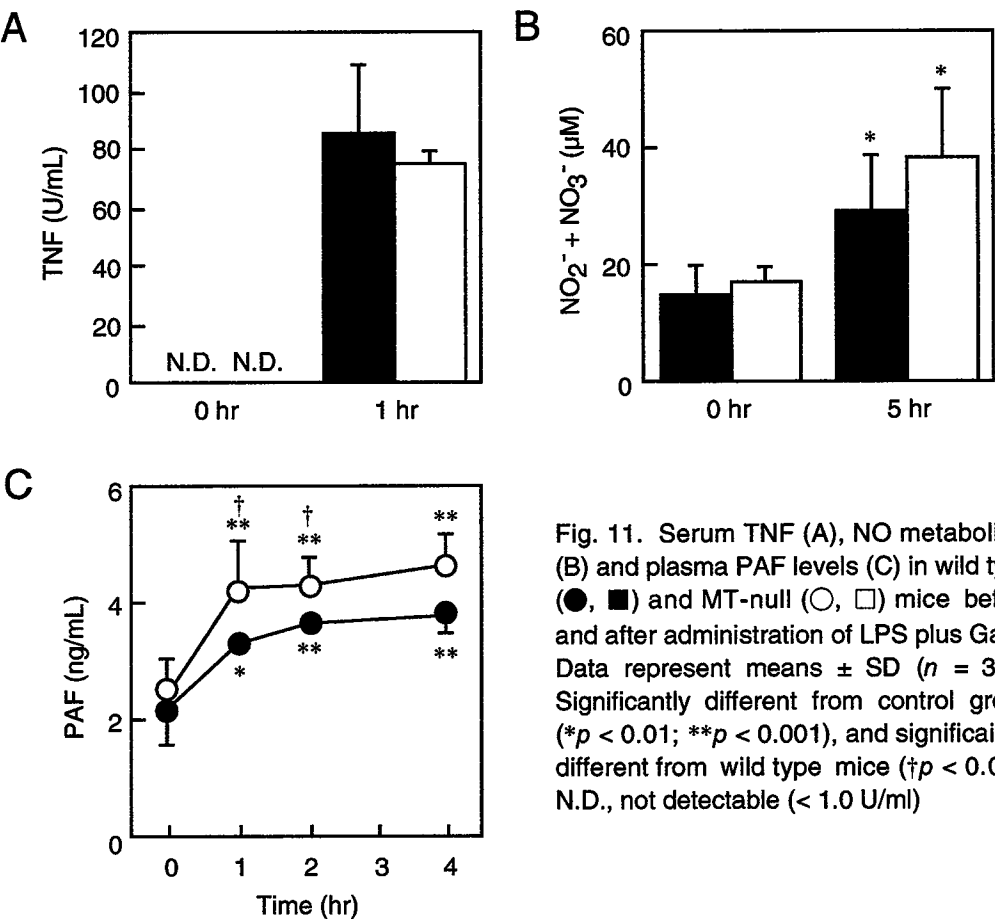
した。

統計分析

有意差検定には ANOVA とポストホックテストとして Fisher's protected least-significant difference テストを用いた。 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

第二項 結果および考察

Fig. 11A に LPS/GalN 投与後の血中TNFレベルを示した。血中TNFレベルはLPS投与1時間後に一過性のピークを示すことが知られているのでこの時点で測定を行った。その結果、NF- κ B制御を受けている TNF 血中レベルに差は認められなかった。また、投与5時間後において NOレベルにも顕著な差が認められなかった (Fig. 11B)。



LPS/GalN 投与後の NO 合成は主に誘導型の NO 合成酵素である iNOS によるものである⁽⁸⁶⁾。iNOS の発現も NF- κ B により制御されている。NF- κ B 活性と MT との関係は現在、MT と NF- κ B との相互作用により NF- κ B が活性化されるという結果⁽³²⁾と NF- κ B 活性化に必要な細胞内レドックス状態の変化を MT が阻害することにより NF- κ B 活性を抑制するという結果⁽³³⁾の相反する 2 つの結果が報告がなされているが、本急性肝炎モデルにおいて MT の NF- κ B 活性修飾作用が発揮されている可能性は低いと考えられる。血中 PAF レベルには有意な差は認められたものの上昇倍率が約 2 倍に過ぎず、致死感受性の差を説明するには不十分であると考えられる (Fig 11C)。以上の結果より、本モデルにおける致死感受性の差は血中メディエーターレベルの差ではなく、主にこれ以降の段階の差に起因しているものと考えた。

第四節 LPS/GalN による PMN 集積作用への MT の影響

MT のラジカルスカベンジ能もまた、MT 欠損による LPS/GalN 惹起肝障害感受性亢進の原因になり得る。つまり、組織学的観察から LPS/GalN 投与したマウス肝臓に PMN が集積・浸潤していることが明らかにされており、PMN が放出する ROS が脂質過酸化や細胞脂質機能を破壊し肝障害を引き起こすと考えられている。このため、ROS 感受性の差は LPS/GalN 惹起肝障害感受性の差としてあらわれる。グルタチオンペルオキシダーゼ (Gpx)-1 は細胞質およびミトコンドリアの主要なグルタチオンペルオキシダーゼ分子種であり、細胞質の抗酸化因子の一因として位置づけられている。この Gpx-1 遺伝子を欠損したマウスは LPS/GalN 惹起致死感受性および酸化ストレスの亢進は確認されたが他のパラメーター (NF- κ B 活性など) には差がないと報告されている⁽⁸⁷⁾。MT 欠損マウスも Gpx-1 欠損マウスと同様の機構により本モデルの致死感受性の差があらわれている可能性が考えられる。そこで ROS 産生以前の段階である、肝臓への PMN 集積までの段階に差が認められるかを検討した。なお、以後の検討はマウスの系統を 129/Sv から LPS に対する感受性の高い 129/Sv $\times$ C57BL/6J に変更して行った。本変更に関立って投与量を LPS 50 μ g/kg、GalN 700 mg/kg とした際に

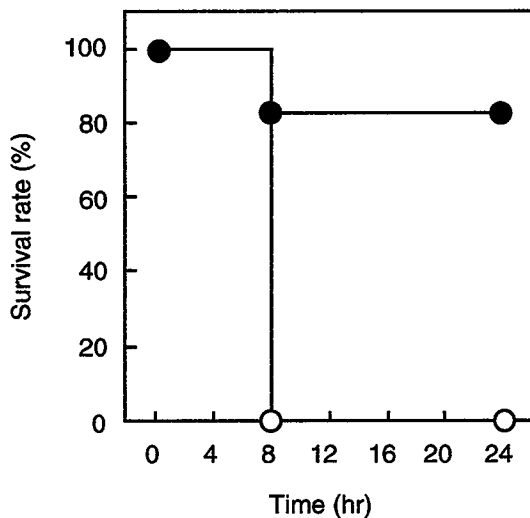


Fig. 12. Survival curve of wild type (●, $n = 5$) and MT-null mice (○, $n = 5$) in response to intraperitoneal administration of LPS (50 $\mu\text{g/kg}$) plus GalN (700 mg/kg). Survival rates in wild type and MT-null mice were significantly different at $p < 0.05$.

今まで同様の致死感受性の差が認められることの確認も行った (Fig. 12)。

第一項 実験材料および実験方法

動物実験および肝臓ミエロペルオキシダーゼ活性の測定

実験動物は第二章、第一節に準じた。

野生型およびMT欠損マウス (8-12週齢, 雄性) にLPS (50 $\mu\text{g/kg}$) とGalN (700 mg/kg) を腹腔内投与し、7時間後に肝臓ミエロペルオキシダーゼ (MPO)活性を測定してPMN数を評価した。MPO活性測定法を以下に示す。エーテル麻酔下肝臓を摘出し、19倍容の 20 mM K-Pi 緩衝液でホモジナイズした。このホモジナイズ液を遠心分離 (9,000 $\times g$, 5分, 4°C) し、沈殿を得た。沈殿を 0.5% hexadecyl trimethyl ammonium 含有 50 mM K-Pi 緩衝液に再懸濁した。再懸濁液を超音波処理 (Sonifier 450; BRANSON, Danbury, CT, USA)、インキュベート (60°C, 2時間) 後、遠心分離 (9,000 $\times g$, 5分) し上清を得た。この上清をMPO活性測定用試料とした。酵素反応は反応液 (1.6 mM 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine, 0.3 mM H_2O_2 , 0.08 M クエン酸-Na 緩衝液, pH 5.4)にMPO活性測定用試料 50 μl を加え、最終容積を 1.0 ml として行った。3分後、2.5 ml の 200 mM 酢酸-Na 緩衝液 (pH 3.0) を加えて酵素反応を停止し、波長655nmの吸光度を測定した。

統計分析

有意差検定法は第三章、第三節に準じた。

第二項 結果および考察

MT欠損マウスにおいて、PMN マーカーである MPO 活性は MT 欠損マウス肝臓でのみ有意に増加していた (Fig. 13)。PMN 抗体による PMN デリーション⁽⁸⁸⁾ や PMN の血管内皮細胞・肝実質細胞への接着に関わる intracellular adhesion molecule-1⁽⁸⁹⁾ および CD11b/CD18 インテグリン抗体⁽⁹⁰⁾ の投与によって LPS/GalN 肝障害が軽減されることが知られており、上記結果は LPS/GalN 肝障害感受性の差を十分説明しうるものと考えられる。一方、MT がラジカルスカベンジ能を有することから、MT 欠損により ROS 感受性が亢進することは容易に予想される。Laso らが MT 欠損細胞が *t*-butylhydroquinone、paraquat に高感受性であることを報告したのを初めとして、MT 欠損細胞・マウスが種々の ROS 産生化合物の毒性に高感受性であることが示されている⁽⁹¹⁾。本モデルにおいて ROS による細胞障害作用への MT の関与については検討を行っていないため、MT の抗酸化作用がどれほどの意味を持つのかは明らかではない。しかしながら、本節の結果は MT 欠損による LPS/GalN 感受性亢進の原因の一つが少なくとも ROS による細胞障害より初期段階にあることを示している。

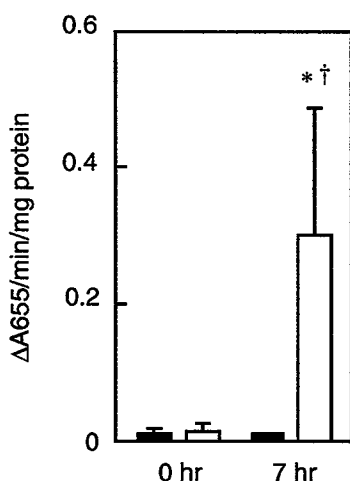


Fig. 13. Hepatic MPO activities in wild type (■) and MT-null (□) mice before and after administration of LPS/GalN. Data represent means $\pm$ SD ($n = 3-4$). *Significantly different from control group ($p < 0.05$). †Significantly different from wild type mice ($p < 0.05$).

第五節 LPS/GalN惹起アポトーシス作用へのMTの影響

LPS/GalN モデルで MT が抗アポトーシス作用を発揮すれば、前節までに得られた結果が説明可能である。Kondo らは抗癌剤である cytosine arabinoside、bleomycin、melphalan、cisplatin によるアポトーシスの出現頻度が MT 欠損細胞で亢進しており、これは MT 欠損細胞が定常状態でアポトーシス促進因子である Bax の発現が高いためではないかと考察している⁽⁹²⁾。このように MT が抗アポトーシス作用を有するとする研究グループもあり、本作用が MT 欠損による感受性亢進の原因である可能性が想定できる。そこで本項では MT の抗アポトーシス作用が肝障害感受性の差として考えうるのかを検討した。

第一項 実験材料および実験方法

試薬

変異型 I κ B 発現アデノウイルスベクター (Ad5I κ B) は University of North Carolina, David A. Brenner 博士より供与された。対照ベクターとして β -ガラクトシダーゼ発現アデノウイルスベクター (Ad5LacZ) を用いた。

動物実験

実験動物は第二章、第一節に準じた。

野生型および MT 欠損マウス (8-12 週齢, 雄性) に LPS (50 μ g/kg) と GalN (700 mg/kg) を腹腔内投与し、エーテル麻酔下門脈から 10 mM EDTA 含有 PBS を灌流した後、肝臓を摘出した。肝臓を同緩衝液でホモジナイズした後フェノールクロロホルム抽出・エタノール沈殿を行い DNA を得た。抽出した DNA を 2.0% アガロースゲルにて泳動し、DNA ラダーを検出した。

初代培養肝細胞の調製および肝細胞への処理

肝細胞は Klaunig らによって改良された、*in situ* 2段階コラゲナーゼ灌流法により単

離した⁽⁹³⁾。実験にはトリパンブルー排除テストにより生存率 80% 以上と判定した細胞を使用した。細胞は 5% FBS, 1 μ M Dex, 1 μ M インスリン含有 Williams' medium E 培地 (ICN, Irvine, CA, USA) を用い、コラーゲン (type I-P; 新田ゼラチン, 大阪) コートした12穴培養プレートに細胞密度 3.6×10^5 cells/well で播種した。2時間の培養後、非接着細胞を培地交換により取り除いた。細胞は24時間培養後、rmTNF- α を各濃度で処理した。転写抑制剤としてアクチノマイシンD (ActD) を用いた実験では、rmTNF- α 処理30分前に培地を 0.1% BSA、400ng/ml ActD含有Williams' medium E培地に交換した。NF- κ B活性化阻害のためにAd5IkBを用いた実験では、rmTNF- α 処理の2時間前から培地を 0.1% BSA 含有 Williams' medium E 培地に交換し、rmTNF- α 処理前の2時間のみ30 M.O.I. のAd5IkBを感染した。rmTNF- α 処理20時間後にMTT法により生細胞数を評価した。

高力価アデノウイルスベクター液の作製および力価測定

アデノウイルスベクターはヒト胎児腎臓細胞株HEK293細胞を用いて増幅し、細胞溶解液の遠心上清をウイルスベクター液として用いた。ウイルスタイターは50% 細胞変性終末点から決定した。

第二項 結果および考察

野生型、MT欠損マウスから初代培養肝細胞を調製し、rmTNF- α によるアポトーシス感受性を比較した。TNF- α によるアポトーシス誘導にはNF- κ Bを介する遺伝子発現を抑制する必要がある^(94, 95) (Fig. 14)、本研究ではこの目的で転写抑制剤のActDもしくはAd5IkBを用いた。Ad5IkBはリン酸化、およびその次のステップであるプロテアソームによる分解を受けない変異型 IkB α (S32A, S36A) を発現することによってNF- κ B活性化シグナルを阻害する⁽⁹⁶⁾。肝細胞がTNF- α 単独処理やActD処理、Ad5IkB感染のみでは障害を受けないことは確認している。また、Ad5IkBのコントロールベクターとしてAd5LacZを用いた際も肝細胞の障害は認められなかった。ActD処理とAd5IkB感染のどちらにおいても両マウスから調製した肝細胞でTNF- α 感受性の差は

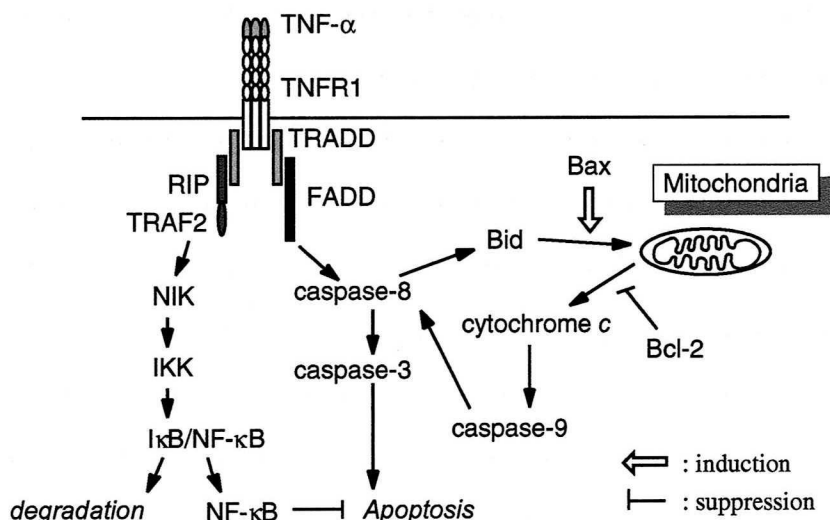


Fig. 14. Proapoptotic and antiapoptotic signaling by TNFR1. TRADD: TNFR1-associated death domain; RIP: receptor-interacting protein; TRAF2: TNFR-associated factor-2; FADD: Fas-associated death domain; NIK: NF-κB-inducing kinase; IKK: IκB kinase complex

認められなかった (Fig. 15A, B)。近年、アポトーシスには、1) caspase-8の著しい活性化が認められる type I 経路、2) caspase-8 のわずかな活性化とcytochrome *c* の遊離が認められる type II 経路、および 3) caspase に非依存の第3の経路が存在し、刺激に応じて細胞はこれらの経路を介してアポトーシスを起こすと考えられるようになった。

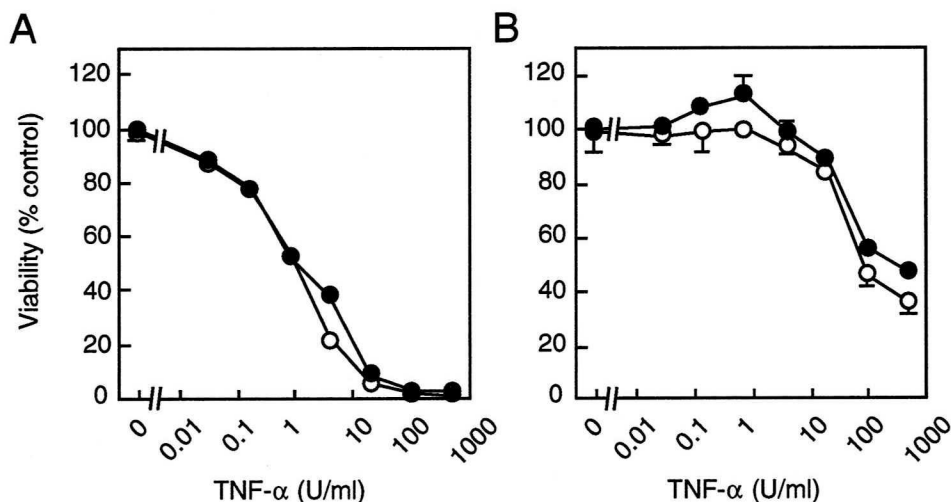


Fig. 15. TNF-α-induced cytotoxicity in primary hepatocytes derived from wild type (●) and MT-null (○) mice. Cell viability was assessed after 20 hours treatment by a MTT assay. Primary hepatocytes were treated with ActD and rmTNF-α (A), infected with Ad5IκB and treated with rmTNF-α (B). Data represent means ± SD ($n = 3$).

肝細胞培養系への TNF- α 処理はActDを用いれば第 3の経路、Ad5IkBを用いれば type II 経路を介してアポトーシスが起こるとされている⁽⁹⁵⁾。また、初代培養肝細胞への TNF- α 処理によりtype I アポトーシスを引き起こす条件は知られていない。Mouse embryonic cell (MEC) においてMT欠損により type II アポトーシスの促進因子である Baxタンパク質レベルが上昇すると報告されていることから⁽⁹²⁾、初代培養肝細胞へのAd5IkB/TNFによるアポトーシス感受性がMT欠損により上昇している可能性を想定した。しかしながら、初代培養肝細胞系ではMTの抗アポトーシス作用は全く観察されなかった。先述のMT欠損による Bax高発現はMEC細胞特異的な現象なのかもしれない。一方、肝臓特異的 Bcl-2 過剰発現マウス⁽⁹⁷⁾ や caspase 阻害剤^(74, 98) を用いた検討から、LPS/GalN惹起アポトーシスはTNFR1を介するtype II アポトーシスであると考えられている。LPS/GalN投与7時間後の肝臓DNAの電気泳動像を観察した結果、MT欠損マウスでのみDNAラダーが観察された (Fig. 16)。本節の結果より、MTが直接肝細胞内で抗アポトーシス作用を発揮しているとは考えられないものの、MTが何らかの間接的機序によりLPS/GalN惹起アポトーシス作用に対して抑制因子として作用していることが示された。

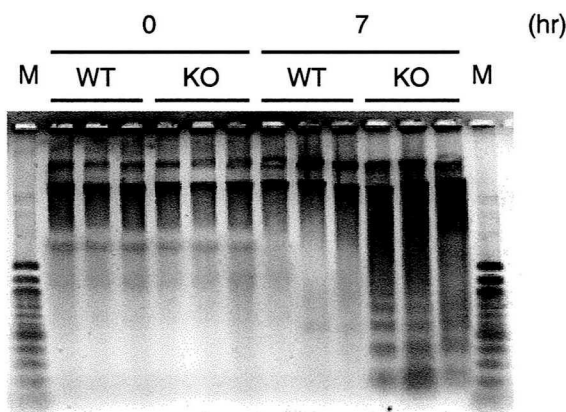


Fig. 16. DNA electrophoresis of liver extracts. DNA was extracted from mice liver before and after administration of LPS/GalN. Extracted DNA was electrophoresed on a 2.0% agarose gel. M; 100 bp ladder marker

第六節 小括

本章はMT欠損によるAGP発現の低下が、LPS/GalN惹起致死感受性の亢進という現象としてあらわれる可能性を示した。LPS/GalN惹起致死感受性亢進の機序は、1) 血中メディエーターレベルの上昇、2) 肝臓のアポトーシス感受性の亢進、3) 肝臓へのPMN集積・浸潤数の増加、4) ROS感受性の亢進という4点が想定できる。MTがNF- κ BのDNA結合活性修飾作用、アポトーシス抑制作用およびラジカルスカベンジ作用を発揮すれば、それぞれ、1)-4)、2)-4)、4) に MT 欠損の影響があらわれると考えられる。また、主たる原因がAGP発現レベル低下にあるならば、2)-4) にMT欠損の影響が認められるはずである。本章での検討の結果、MT欠損の影響は 2)-4) に認められた。第五節での詳細な検討によりMT欠損の影響は初代培養肝細胞を用いたアポトーシス誘導系では認められず、*in vivo* でのみ確認された。AGPもまた、MT 同様 *in vivo* で抗アポトーシス作用を発揮するが、培養細胞を用いたアポトーシス誘導系でアポトーシスを抑制しないと報告されている⁽⁹⁹⁾。これらを総合すると、MT欠損マウスでのLPS/GalN致死感受性増大の原因は急性期におけるAGP誘導率の低下にあると考えられる。

総 括

本研究ではMTの遺伝子発現調節作用が *in vivo* で発揮されていることを示すとともに、遺伝子発現調節を介したMTの生体防御作用の存在の可能性を示した。MTの研究は1) 重金属との結合・解毒やフリーラジカスキャベンジ能に注目し、MTを生体防御因子として位置づける研究、および2) MTの誘導に関する研究という二方向から行われてきた。この中でもMTの誘導に関する研究では、1982年にPalmiterが成長ホルモンをMTプロモーターを利用してマウスに強制発現し、ジャイアントマウスを作製した例は余りにも有名である⁽¹⁰⁰⁾。MTプロモーターは比較的強いプロモーター活性を有すると共に重金属刺激により活性化されるという特性を生かして他の遺伝子の誘導型強制発現に利用されてきた。重金属などの投与以外にもMTの誘導条件は数多く知られており、炎症^(13, 14)・新生仔期⁽¹⁵⁾・肝再生^(16, 17)・担癌^(18, 19)・拘束ストレス^(20, 21)などで肝臓のMTが誘導されることが明らかにされている。これらの時期におけるMT誘導のメディエーターはIL-6やグルココルチコイドであることが示されている。しかしながらその一方で、MT誘導の意義に関する知見は非常に限られており、その意義をZn結合能もしくはラジカスキャベンジ能に求めるものがほとんどであった。

まず第一章では、MT欠損マウスと改良型DD法を駆使してMTが高発現する新生仔期にMT欠損により発現上昇する遺伝子2種と発現低下する遺伝子1種を同定した。MT欠損により発現上昇する2種の遺伝子はともに抗酸化作用に関わっている可能性のあるtransketolaseおよびvanin-3であった。これら遺伝子の発現上昇は抗酸化因子であるMTの欠損を補うための代償機構であると考えられる。MT欠損により発現低下する遺伝子はAPPの一つであるcontrapsinであった。MT欠損により発現が低下することからMTの転写活性化機構の存在が示唆された。

次いで第二章では、急性期に誘導されるMTがAPPの一つ、AGP遺伝子の発現を上昇することを見いだした。APRはIL-1、-6等のサイトカインをメディエーターとする反応で、炎症部位でのサイトカイン産生、肝実質細胞のレセプター刺激、細胞内シグナル伝達、転写因子の活性化に至る反応である。APPはこの一連の応答により誘

導される血漿タンパク質であり、何らかの形で炎症反応を調節する役割を果たしていると考えられる。MTはAPR同様の機序、つまり、IL-6が肝実質細胞のIL-6レセプターに結合し、JAK-STAT経路を活性化し、プロモーター領域のIL-6 responsive element type 2を介して発現上昇するとされている^(101, 102)。MTは血漿タンパク質ではないことからAPPとして位置づけられていないが、上記のことを考えあわせるとMTをAPPとしてとらえ炎症反応との接点を詳細に検討すべきであると考えられる。また、LPS投与やIL-6処理によりMT誘導とともにZn応答性転写因子であるMTF-1が活性化されることと、このMTF-1活性化がMT欠損により消失するという結果にもとづき、このMTF-1活性化機序がMT誘導の結果引き起こされる細胞内Znの増加によるというモデルを提示した。MT遺伝子の発現上昇により金属非結合型MT (apoMT) が合成される。このapoMTはただちに細胞内のZnと結合する。Znは血漿から十分供給されるのでMT誘導は細胞内Znの増加を引き起こす。その結果として細胞内Znプールが増加し、MTF-1が活性化されるというモデルである。転写因子は核内でその活性を発揮する。前述のモデルではMTが核内に移行する必要はないが、種々の条件下でMTは核移行することが確認されている^(25, 26, 35-37)。このMT核移行の意義としてDNAをROSから保護するという仮説が提示され、核移行シグナルを連結したMTを強制発現することによりこの仮説の妥当性が示されている⁽¹⁰³⁾。しかしながら、MTが核内で何らかの転写活性を修飾している可能性も残っており、このような視点からの研究が待たれる。

さらに第三章では、炎症モデルの一つであるLPS/GalN惹起急性肝炎に対し、MT欠損マウスが高感受性であることを示した。この急性肝炎モデルにおける肝障害および致死作用はAGP投与によって軽減されることが知られている。AGPによる保護作用の詳細な機序は不明であるが、AGP投与により肝障害に先立って起こる肝アポトーシスの抑制が認められると報告されている⁽⁷⁰⁾。MT欠損マウスでは野生型マウスとで比較してアポトーシスがより重篤であったことからMTはAGPと同様の作用機序により保護作用を発揮していると考えられた。つまり、先述のMT欠損マウスでのAPRにおけるAGP遺伝子発現誘導倍率低下が急性肝炎モデルにおける肝障害および致死作用感受性の亢進の原因である可能性を示唆した。

以上、本研究ではMTが生体内で遺伝子発現調節を行っていることを初めて明らかにするとともに、この遺伝子発現調節作用もまた、MTの生体防御作用の一端を担っていることを示した。MTは新生仔期および急性期のみならず、様々な局面で誘導される。他のMT誘導刺激、例えば肝再生、発癌、拘束ストレス等においてもMTの遺伝子発現調節作用が発揮されているのか、また、遺伝子発現調節作用が発揮されているならばそれはどのような意義があるのかなど解明されなければならない点も多く残されている。重金属結合タンパク質としてMTが発見されてから40年以上がたつ。今日までにMTの役割としては主として重金属の解毒とフリーラジカルの消去が注目されてきたが、本研究はMT研究の新天地を切り開いたものとする。

結 論

MTによる遺伝子発現調節および遺伝子発現調節を介した MTの生体防御作用に関する検討を行い、以下の結論を得た。

1. 新生仔肝臓においてMT欠損により発現変動する遺伝子を同定した。また、MT発現が高い時期にMT欠損の影響が強くあらわれることを示し、MT誘導が遺伝子発現を調節するための生体応答である可能性を示した。
2. MTが細胞内Zn量の増加・MTF-1活性化を介して遺伝子発現を亢進するというモデルを提唱し、実際にMTがMTF-1支配のAPPの一つであるAGPの発現を上昇していることを示した。
3. MT欠損マウスがLPS/GalN惹起肝障害に高感受性であることを明らかにし、この原因がAGP発現低下にある可能性を示した。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、終始暖かい御指導ならびに御鞭撻を賜りました恩師、大阪大学大学院薬学研究科教授、田中慶一先生に篤く御礼申し上げます。

また、本研究の遂行にあたり、終始御指導ならびに御助言をいただきました、大阪大学大学院薬学研究科講師、伊藤徳夫先生、大阪大学大学院助手、中西剛先生に深謝致します。

動物実験に関し、種々御便宜、御指導を賜りました大阪大学大学院微生物研究所、西宗義武先生に深く感謝致します。

さらに、本研究に関する種々御助言をいただきました大阪大学大学院微生物研究所、興梠順也博士に心より感謝致します。

病理組織検査に関し、種々御便宜、御指導を賜りました大日本製薬株式会社 糺谷高敏博士に深く感謝致します。

リコンビナントヒトIL-6を御供与いただきました中外製薬株式会社に感謝致します。また、Ad5IlkBベクターを御供与いただきましたUniversity of North Carolina、David A. Brenner 博士に感謝致します。

さらに、本研究を遂行するにあたり、苦労を共にし、励ましあった竹原都修士、小黒育代学士、石崎順一学士に心から感謝いたします。

また、本稿をまとめるにあたり御協力いただきました藤田勇修士をはじめとする大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野の皆様には感謝の意を表します。

最後に、在学中の経済的援助を賜りました、日本育英会に感謝致します。

参 考 文 献

1. Margoshes, M. and Vallee, B.L. (1957) *J Am Chem Soc* 79, 4813-4.
2. Miura, T., Muraoka, S. and Ogiso, T. (1997) *Life Sci* 60, 301-9.
3. Hamer, D.H. (1986) *Annu Rev Biochem* 55, 913-51.
4. Stuart, G.W., Searle, P.F. and Palmiter, R.D. (1985) *Nature* 317, 828-31.
5. Westin, G. and Schaffner, W. (1988) *Nucleic Acids Res* 16, 5771-81.
6. Bittel, D., Dalton, T., Samson, S.L., Gedamu, L. and Andrews, G.K. (1998) *J Biol Chem* 273, 7127-33.
7. Smirnova, I.V., Bittel, D.C., Ravindra, R., Jiang, H. and Andrews, G.K. (2000) *J Biol Chem* 275, 9377-84.
8. DiSilvestro, R.A. and Cousins, R.J. (1984) *Life Sci* 35, 2113-8.
9. Schroeder, J.J. and Cousins, R.J. (1990) *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 3137-41.
10. Sato, M., Sasaki, M., Hojo, H. (1994) *Int J Immunopharmacol* 16, 187-95.
11. Friedman, R.L. and Stark, G.R. (1985) *Nature* 314, 637-9.
12. Waelput, W., Verhee, A., Broekaert, D., Eyckerman, S., Vandekerckhove, J., Beattie, J.H. and Tavernier, J. (2000) *Biochem J* 1, 55-61.
13. Sobocinski, P.Z., Canterbury, W., Jr., Mapes, C.A. and Dinterman, R.E. (1978) *Am J Physiol* 234, E399-406.
14. Itoh, N., Kasutani, K., Muto, N., Otaki, N., Kimura, M. and Tanaka, K. (1996) *Toxicology* 112, 29-36.
15. Quaife, C., Hammer, R.E., Mottet, N.K. and Palmiter, R.D. (1986) *Dev Biol* 118, 549-55.
16. Ohtake, H. and Koga, M. (1979) *Biochem J* 183, 683-90.
17. Molotkov, A., Nishimura, N., Satoh, M. and Tohyama, C. (2000) *Life Sci* 66, 963-70.
18. Takeda, A., Sato, T., Tamano, H. and Okada, S. (1992) *Biochem Biophys Res Commun* 189, 645-9.

19. Takeda, A., Tamano, H., Hoshino, A. and Okada, S. (1994) *Biol Trace Elem Res* 41, 157-64.
20. Ghoshal, K., Wang, Y., Sheridan, J.F. and Jacob, S.T. (1998) *J Biol Chem* 273, 27904-10.
21. Hernandez, J., Carrasco, J., Belloso, E., Giralt, M., Bluethmann, H., Kee Lee, D., Andrews, G.K. and Hidalgo, J. (2000) *Cytokine* 12, 791-6.
22. Michalska, A.E. and Choo, K.H. (1993) *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8088-92.
23. Masters, B.A., Kelly, E.J., Quaife, C.J., Brinster, R.L. and Palmiter, R.D. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 584-8.
24. Beattie, J.H., Wood, A.M., Newman, A.M., Bremner, I., Choo, K.H., Michalska, A.E., Duncan, J.S. and Trayhurn, P. (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 358-63.
25. Banerjee, D., Onosaka, S. and Cherian, M.G. (1982) *Toxicology* 24, 95-105.
26. Danielson, K.G., Ohi, S. and Huang, P.C. (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* 79, 2301-4.
27. Nagano, T., Itoh, N., Ebisutani, C., Takatani, T., Miyoshi, T., Nakanishi, T. and Tanaka, K. (2000) *J Cell Physiol* 185, 440-6.
28. Woo, E.S., Dellapiazza, D., Wang, A.S. and Lazo, J.S. (2000) *J Cell Physiol* 182, 69-76.
29. Zeng, J., Heuchel, R., Schaffner, W. and Kagi, J.H. (1991) *FEBS Lett* 279, 310-2.
30. Zeng, J., Vallee, B.L. and Kagi, J.H. (1991) *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 9984-8.
31. Cano-Gauci, D.F. and Sarkar, B. (1996) *FEBS Lett* 386, 1-4.
32. Abdel-Mageed, A.B. and Agrawal, K.C. (1998) *Cancer Res* 58, 2335-8.
33. Sakurai, A., Hara, S., Okano, N., Kondo, Y., Inoue, J. and Imura, N. (1999) *FEBS Lett* 455, 55-8.
34. Roesijadi, G., Bogumil, R., Vasak, M. and Kagi, J.H. (1998) *J Biol Chem* 273, 17425-32.
35. Tohyama, C., Suzuki, J.S., Hemelraad, J., Nishimura, N. and Nishimura, H. (1993) *Hepatology* 18, 1193-201.
36. Tsujikawa, K., Suzuki, N., Sagawa, K., Itoh, M., Sugiyama, T., Kohama, Y., Otaki,

- N., Kimura, M. and Mimura, T. (1994) *Eur J Cell Biol* 63, 240-6.
37. Lau, J.C. and Cherian, M.G. (1998) *Biochem Cell Biol* 76, 615-23.
 38. Palmiter, R.D., Findley, S.D., Whitmore, T.E. and Durnam, D.M. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 6333-7.
 39. Quaife, C.J., Findley, S.D., Erickson, J.C., Froelick, G.J., Kelly, E.J., Zambrowicz, B.P. and Palmiter, R.D. (1994) *Biochemistry* 33, 7250-9.
 40. Luda, D., Yun-Fai, C.L., Aaron, P.C., Alex, C., Fauzia, M., Betty, H., Sergey, L., Konstantin, L., Nadya, G., Eugene, D.S. and Paul, D.S. (1996) *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 6025-30.
 41. Liang, P. and Pardee, A.B. (1992) *Science* 257, 967-71.
 42. Kohroki, J., Tsuchiya, M., Fujita, S., Nakanishi, T., Itoh, N. and Tanaka, K. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 262, 365-7.
 43. Kershaw, W.C., Lehman-McKeeman, L.D. and Klaassen, C.D. (1990) *Toxicol Appl Pharmacol* 104, 267-75.
 44. Maras, B., Barra, D., Dupre, S. and Pitari, G. (1999) *FEBS Lett* 461, 149-52.
 45. Aurrand-Lions, M., Galland, F., Bazin, H., Zakharyev, V.M., Imhof, B.A. and Naquet, P. (1996) *Immunity* 5, 391-405.
 46. Granjeaud, S., Naquet, P. and Galland, F. (1999) *Immunogenetics* 49, 964-72.
 47. Ghoshal, K., Majumder, S., Li, Z., Bray, T.M. and Jacob, S.T. (1999) *Biochem Biophys Res Commun* 264, 735-42.
 48. Dalton, T.P., Shertzer, H.G. and Puga, A. (1999) *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 67-101.
 49. Philcox, J.C., Coyle, P., Michalska, A., Choo, K.H. and Rofe, A.M. (1995) *Biochem J* 308, 543-6.
 50. Furst, P. and Hamer, D. (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 5267-71.
 51. de Pater, S., Greco, V., Pham, K., Memelink, J. and Kijne, J. (1996) *Nucleic Acids Res* 24, 4624-31.
 52. Otsuka, F., Okugaito, I., Ohsawa, M., Iwamatsu, A., Suzuki, K. and Koizumi, S. (2000) *Biochim Biophys Acta* 1492, 330-40.

53. Eaton, D.L. and Toal, B.F. (1982) *Toxicol Appl Pharmacol* 66, 134-42.
54. Dalton, T.P., Li, Q., Bittel, D., Liang, L. and Andrews, G.K. (1996) *J Biol Chem* 271, 26233-41.
55. Dalton, T., Palmiter, R.D. and Andrews, G.K. (1994) *Nucleic Acids Res* 22, 5016-23.
56. Raetz, C.R. (1990) *Annu Rev Biochem* 59, 129-70.
57. Roife, A.M., Philcox, J.C. and Coyle, P. (1996) *Biochem J* 314, 793-7.
58. Kishimoto, T., Akira, S. and Taga, T. (1992) *Int J Immunopharmacol* 14, 431-8.
59. Schindler, C. and Darnell, J.J. (1995) *Annu Rev Biochem* 64, 621-51.
60. Radtke, F., Georgiev, O., Muller, H.P., Brugnera, E. and Schaffner, W. (1995) *Nucleic Acids Res* 23, 2277-86.
61. Chen, X., Agarwal, A. and Giedroc, D.P. (1998) *Biochemistry* 37, 11152-61.
62. Chen, X., Chu, M. and Giedroc, D.P. (1999) *Biochemistry* 38, 12915-25.
63. Palmiter, R.D. (1995) *Toxicol Appl Pharmacol* 135, 139-46.
64. Langmade, S.J., Ravindra, R., Daniels, P.J. and Andrews, G.K. (2000) *J Biol Chem* 275, 34803-9.
65. Heuchel, R., Radtke, F., Georgiev, O., Stark, G., Aguet, M. and Schaffner, W. (1994) *EMBO J* 13, 2870-5.
66. Yoo, H.Y., Chang, M.S. and Rho, H.M. (1999) *Mol Gen Genet* 262, 310-3.
67. Yiangou, M., Ge, X., Carter, K.C. and Papaconstantinou, J. (1991) *Biochemistry* 30, 3798-806.
68. Udom, A.O. and Brady, F.O. (1980) *Biochem J* 187, 329-35.
69. Hochepped, T., Van Molle, W., Berger, F.G., Baumann, H. and Libert, C. (2000) *J Biol Chem* 275, 14903-9.
70. Libert, C., Brouckaert, P. and Fiers, W. (1994) *J Exp Med* 180, 1571-5.
71. Galanos, C., Freudenberg, M.A. and Reutter, W. (1979) *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 5939-43.
72. Tiegs, G., Wolter, M. and Wendel, A. (1989) *Biochem Pharmacol* 38, 627-31.
73. Leist, M., Gantner, F., Bohlinger, I., Tiegs, G., Germann, P.G. and Wendel, A. (1995)

Am J Pathol 146, 1220-34.

74. Jaeschke, H., Fisher, M.A., Lawson, J.A., Simmons, C.A., Farhood, A. and Jones, D.A. (1998) *J Immunol* 160, 3480-6.
75. Iszard, M.B., Liu, J. and Klaassen, C.D. (1995) *Toxicology* 104, 25-33.
76. Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M. (1985) *FEBS Lett* 183, 265-9.
77. Cagen, S.Z. and Klaassen, C.D. (1979) *Toxicol Appl Pharmacol* 51, 107-16.
78. Itoh, N., Kimura, T., Nakanishi, H., Muto, N., Kobayashi, M., Kitagawa, I. and Tanaka, K. (1997) *Toxicol Lett* 93, 135-40.
79. Bellezzo, J.M., Leingang, K.A., Bulla, G.A., Britton, R.S., Bacon, B.R. and Fox, E.S. (1998) *J Lab Clin Med* 131, 36-44.
80. Morikawa, A., Kato, Y., Sugiyama, T., Koide, N., Chakravorty, D., Yoshida, T. and Yokochi, T. (1999) *Infect Immun* 67, 1018-24.
81. Libert, C., Van Molle, W., Brouckaert, P. and Fiers, W. (1995) *J Inflamm* 46, 139-43.
82. Wang, A.M., Creasey, A.A., Ladner, M.B., Lin, L.S., Strickler, J., Van Arsdell, J.N., Yamamoto, R. and Mark, D.F. (1985) *Science* 228, 149-54.
83. Sherman, P.A., Laubach, V.E., Reep, B.R. and Wood, E.R. (1993) *Biochemistry* 32, 11600-5.
84. Sugatani, J., Miwa, M., Komiyama, Y. and Murakami, T. (1993) *J Immunol Methods* 166, 251-61.
85. Pinckard, R.N., Farr, R.S. and Hanahan, D.J. (1979) *J Immunol* 123, 1847-57.
86. Kroncke, K.D., Fehsel, K. and Kolb-Bachofen, V. (1997) *Nitric Oxide* 1, 107-20.
87. Jaeschke, H., Ho, Y.S., Fisher, M.A., Lawson, J.A. and Farhood, A. (1999) *Hepatology* 29, 443-50.
88. Komatsu, Y., Shiratori, Y., Kawase, T., Hashimoto, N., Han, K., Shiina, S., Matsumura, M., Niwa, Y., Kato, N., Tada, M., Ikeda, Y., Tanaka, M. and Omata, M. (1994) *Hepatology* 20, 1548-56.
89. Essani, N.A., Fisher, M.A., Farhood, A., Manning, A.M., Smith, C.W. and Jaeschke, H. (1995) *Hepatology* 21, 1632-9.

90. Jaeschke, H., Farhood, A. and Smith, C.W. (1991) *Am J Physiol* 261, G1051-6.
91. Lazo, J.S. and Basu, A. (1991) *Semin Cancer Biol* 2, 267-71.
92. Kondo, Y., Woo, E.S., Michalska, A.E., Choo, K.H. and Lazo, J.S. (1995) *Cancer Res* 55, 2021-3.
93. Klaunig, J.E., Goldblatt, P.J., Hinton, D.E., Lipsky, M.M., Chacko, J. and Trump, B.F. (1981) *In Vitro* 17, 913-25.
94. Bradham, C.A., Qian, T., Streetz, K., Trautwein, C., Brenner, D.A. and Lemasters, J.J. (1998) *Mol Cell Biol* 18, 6353-64.
95. Jones, B.E., Lo, C.R., Liu, H., Srinivasan, A., Streetz, K., Valentino, K.L. and Czaja, M.J. (2000) *J Biol Chem* 275, 705-12.
96. Xu, Y., Bialik, S., Jones, B.E., Iimuro, Y., Kitsis, R.N., Srinivasan, A., Brenner, D.A. and Czaja, M.J. (1998) *Am J Physiol* 275, C1058-66.
97. Van Molle, W., Denecker, G., Rodriguez, I., Brouckaert, P., Vandenabeele, P. and Libert, C. (1999) *J Immunol* 163, 5235-41.
98. Mignon, A., Rouquet, N., Fabre, M., Martin, S., Pages, J.C., Dhainaut, J.F., Kahn, A., Briand, P. and Joulin, V. (1999) *Am J Respir Crit Care Med* 159, 1308-15.
99. Van Molle, W., Libert, C., Fiers, W. and Brouckaert, P. (1997) *J Immunol* 159, 3555-64.
100. Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trumbauer, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C. and Evans, R.M. (1982) *Nature* 300, 611-5.
101. Kasutani, K., Itoh, N., Kanekiyo, M., Muto, N. and Tanaka, K. (1998) *Toxicol Appl Pharmacol* 151, 143-51.
102. Lee, D.K., Carrasco, J., Hidalgo, J. and Andrews, G.K. (1999) *Biochem J* 337, 59-65.
103. Woo, E.S. and Lazo, J.S. (1997) *Cancer Res* 57, 4236-41.

